

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月19日

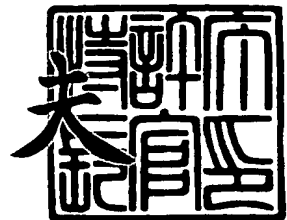
出 願 番 号
Application Number: PCT/JPO2/09611

出 願 人
Applicant (s): 独立行政法人科学技術振興機構
山口 正義

2004 年 5 月 13 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



出証平 16-500156

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月19日 (19.09.2002) 木曜日 14時03分31秒

YG2002-18PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	PCT/JP 02/09611
0-2	国際出願日	19.09.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	YG2002-18PCT
I	発明の名称	レギュカルチン過剰発現モデル動物
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	科学技術振興事業団
II-4en	Name	JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
II-5ja	あて名:	332-0012 日本国 埼玉県 川口市 本町四丁目1番8号
II-5en	Address:	1-8, Honcho 4-chome Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	048-226-5619
II-9	ファクシミリ番号	048-226-5652
III-I	その他の出願人又は発明者	
III-I-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-I-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-I-4ja	氏名 (姓名)	山口 正義
III-I-4en	Name (LAST, First)	YAMAGUCHI, Masayoshi
III-I-5ja	あて名:	491-0913 日本国 静岡県 静岡市 瀬名川一丁目15番5号
III-I-5en	Address:	15-5, Senagawa 1-chome, Shizuoka-shi, Shizuoka 491-0913 Japan
III-I-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-I-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

YG2002-18PCT

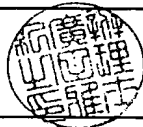
原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月19日（19.09.2002）木曜日 14時03分31秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	廣田 雅紀 HIROTA, Masanori 107-0052 日本国 東京都 港区 赤坂二丁目8番5号若林ビル3階
IV-1-2en	Address:	3F, Wakabayashi Building, 8-5, Akasaka 2-chome Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5575-6500
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5575-6578
IV-1-5	電子メール	hirota-t@interlink.or.jp
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	KR US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	出願日	2001年09月20日 (20.09.2001)
VI-1-2	出願番号	特願2001-287698
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-2-1	出願日	2002年06月18日 (18.06.2002)
VI-2-2	出願番号	特願2002-177666
VI-2-3	国名	日本国 JP
VI-3	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1, VI-2

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月19日（19.09.2002）木曜日 14時03分31秒

YG2002-18PCT

VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	4	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	30	-
IX-3	請求の範囲	5	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	5	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数（明細書の配列表を除く）	45	
IX-6	明細書の配列表	5	-
IX-7	合計	50	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本	✓	-
IX-11	包括委任状の写し	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16 (i)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写し（国際出願の一部を構成しない）	-	1 フロッピーディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フロッピーディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
IX-18	その他	陳述書	-
IX-18	その他	FDの情報を記録した書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)		

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	19.09.02
------	------------------------	----------

特許協力条約に基づく国際出願願書

YG2002-18PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月19日（19.09.2002）木曜日 14時03分31秒

10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明 細 書

レギュカルチン過剰発現モデル動物

5 技術分野

- 本発明は、レギュカルチン遺伝子導入トランスジェニック非ヒト動物、詳しくは、レギュカルチン遺伝子が導入され体重増加抑制能を有するトランスジェニック非ヒト動物や、かかるトランスジェニック非ヒト動物を用いるレギュカルチンの製造方法や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法等に関する。また本発明は、骨粗鬆症に代表される骨病態のモデル動物、より詳しくは、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物から、骨の形態学的測定評価や骨成分の生化学的測定評価により選抜・確認され、骨組織の脆弱化、骨形態変化、骨成長遅延等の骨病態を呈する骨病態モデル動物や、該骨病態のモデル動物を用いた骨粗鬆症に代表される骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

- ペプチドホルモンが細胞膜の受容体に結合し、細胞内にその情報を伝達する仕組みの中で、 Ca^{2+} は主役を演じている。細胞内には Ca^{2+} を結合する多くのタンパク質が存在するが、その作用を増幅するタンパク質として、カルモジュリンは重要な役割を果たしており、 Ca^{2+} はこのカルモジュリンに結合し、細胞機能の調節に関与する各種の酵素を活性化することが解明されている（Science, 202, 19-27, 1984）。また、 Ca^{2+} がプロテインキナーゼCやその他の Ca^{2+} 結合タンパク質（酵素

も含む) に作用することも知られている (Science, 233, 305-312, 1986)。レギュカルチンも、本発明者らによりラット肝細胞質から単離された Ca^{2+} 結合蛋白質である。

レギュカルチンは、分子量が 33388 の Ca^{2+} 結合タンパク質で、
5 その Ca^{2+} 結合定数が $4.19 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ を示し、6 ~ 7 個の高親和性 Ca^{2+} 結合部位を持ち、 α -ヘリックス構造を 34% 含む、肝臓に顕著に存在する等電点 pI 5.20 の酸性蛋白質である。レギュカルチンは、カルモジュリンや他の多くの Ca^{2+} 結合タンパク質にみられる部位 EF ハンド構造 (領域) を含まない特異なタンパク質で、例えば、
10 Ca^{2+} を結合することにより、カルモジュリンは α -ヘリックス含量が増加し、その構造が堅固になるが、レギュカルチンは α -ヘリックス含量が減少する。また一方、細胞機能調節において、レギュカルチンは、カルモジュリンによる酵素活性化を阻害し、プロテインキナーゼ C の活性化をも阻害することが明らかになっている。このように、レギュカルチン
15 は、シグナリングの制御タンパク質として機能するなど多くの知見が蓄積されている (FEBS Lett, 327, 251-255, 1993)。

レギュカルチン遺伝子は、ラットにおいて X 染色体 (Xq 11.1-12) に存在し、ヒトにおいても X 染色体に位置する。レギュカルチン遺伝子は、
20 ラットやヒトの他、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ等の高等動物に見い出されているが酵母にはなく、高度に分化されたタンパク質をコードするものと考えられている。レギュカルチン cDNA はクローニングされており、その全構造も決定されている (特開平 7-123985 号公報)。ラット肝のレギュカルチン cDNA は、全アミノ酸をコードする塩基対が 0.897 kb であり、299 のアミノ酸を翻訳す
25 る。また、マウス肝やヒト肝のレギュカルチン cDNA の塩基配列も決定されており、ラット肝のレギュカルチン cDNA と比較して、それぞ

れ94%と約89%のホモロジーを有している。レギュカルチンmRNAの発現は、ヒト、ラット、マウス、ウシ、ニワトリ等の肝臓においてみられ、これらの肝臓にはレギュカルチンタンパク質の存在も確認されている。

- 5 レギュカルチンは、多機能性を有する細胞内 Ca^{2+} シグナリングの制御蛋白質として特徴を有する蛋白質であり、細胞機能調節に關与する重要な蛋白質であることが知られている (Life Sciences 66, 1769-1780, 2000、Biochemical and Biophysical Research Communications 276, 1-6, 2000)。また、生体内における肝臓や腎臓におけるレギュカルチン
- 10 の発現が肝障害 (Molecular and Cellular Biochemistry 131, 173-179, 1994)や腎障害 (Molecular and Cellular Biochemistry 151, 55-60, 1995)時に低下することが動物実験的に明らかにされており、レギュカルチンと病態成因との關連が示唆されている。そして、GOT、GPT等の既存の肝機能マーカーと異なって肝臓に特異的に存在するレギュカルチン
- 15 の血清中の濃度を測定することにより、肝疾患患者血清を鑑別する方法、すなわち、肝疾患患者の血清ではレギュカルチンが有意に上昇している一方、健常人の血清ではレギュカルチンはほとんど検出されず、その測定が肝疾患患者血清の鑑別手段として有用であることも知られている (特開平10-26623号公報)。
- 20 他方、骨組織は、骨細胞と基質からなり、1/3はコラーゲンを主成分とする有機質、2/3はカルシウムーリンの骨塩である無機質からできており、構造上は緻密質と海綿質と皮質に分けられ、例えば長骨の骨幹は緻密質、骨端は皮質で囲まれた海綿質から構成されている。骨は一旦形成された後は全く変化しない構築物ではなく、骨形成と骨吸収のバ
- 25 ランスの上にその構造および量は維持されている。従って、加齢あるいはその他の原因によりそのバランスが崩れると、種々の骨疾患を発症す

る。骨疾患のうち、カルシウム塩が骨から血液中に溶出してゆく骨吸収の異常亢進によって起きるものとしては、骨髄腫やリンパ腫などが原因で起こる悪性高カルシウム血症、局所性骨吸収によりもたらされる骨ペーজেット病、骨の絶対量が減少しているが骨の質的な変化を伴わない骨粗鬆症等が挙げられる。これらの疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となることが知られており、現在、これらの疾患は高年齢人口の増加に伴い社会問題化している。

その他、高カルシウム血症、低カルシウム血症、副甲状腺機能亢進症、くる病、骨軟化症、骨粗鬆症、骨減少症などの骨疾患、糸球体腎炎、糸球体硬化症、慢性腎炎、腎不全などの腎臓疾患、悪性腫瘍、乾癬症あるいはそれらの合併症などの病態モデル動物として利用することができ、これらの病態機序の解明および疾患の治療方法の検討、ならびに治療薬のスクリーニングを行うことが可能な、外来性25-水酸化ビタミンD₃24-水酸化酵素遺伝子またはその変異遺伝子を組み込んだDNAを有する非ヒト哺乳動物が知られている（特開平11-9140号公報）。

レギュカルチンタンパク質は、肝臓に特異発現される他、腎臓、心臓、大脳（神経細胞）にも低レベルで発現し、細胞内の Ca^{2+} シグナリング関連細胞機能の調節に関与し、その発現が低下すると生理的異常を来す特異な多機能性蛋白質であり、これまでラットの肝臓から単離した蛋白質や抗レギュカルチンモノクローナル抗体を用いて、その機能解析が行われ、上記のカルシウムシグナルの制御因子としての役割の他、細胞内カルシウム輸送酵素の調節や、プロテアーゼの活性化因子としての役割や、細胞核のカルシウム輸送の調節、細胞核DNA分解における役割、肝再生時の細胞核機能における役割等の細胞核機能の調節や、腎尿細管カルシウム再吸収における役割など、多くの生体調節におけるレギュカルチンの機能的役割が本発明者により明らかにされている。

本発明者は、レギュカルチンの種々の機能的役割の解明についての研究過程で、レギュカルチンが他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質とは異なる特異的作用を有する点に着目し、カルシウムが関与する各種細胞の機能調節は、生体内におけるレギュカルチンの発現量とカルモジュリン

5 ははじめとする他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質の発現量とのバランスの上に成立していると考え、レギュカルチンの発現量と他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質の発現量とのバランスが崩れた場合に、生体に生じる変化・影響を調べることにした。本発明の課題は、元来高等動物の肝臓等に発現しているレギュカルチンを過剰に発現させ、他の数多くの

10 Ca^{2+} 結合タンパク質とのバランスを崩した場合に、生体にどのような変化・影響が生じるかを調べるためのツールであるレギュカルチン過剰発現モデル動物を提供することにある。

また従来、骨粗鬆症に代表されるカルシウム骨代謝に係り、高齢化や特に女性において多発する骨病態の予防、治療薬剤開発には、卵巢摘出

15 ラットが用いられるが、卵巢摘出動物は外科的摘出手術を要し、さらに骨量減少を起こさせるまでに3ヶ月以上の飼育が必要で、研究経費が高額になるばかりでなく技術的、時間的な制約も多かった。また臨床面において見られる他の骨病態モデル動物として炎症性（リュウマチ）関節炎骨病態モデル動物があるが、これは薬物投与により発症させるため、

20 他の副作用を伴い生理的に問題があった。本発明の課題はまた、上記問題を解決することができる、卵巢摘出等の外科的摘出手術を要することなく、さらに骨量減少を起こさせるまでの飼育期間が不要であり、副作用を伴うなどの生理的な問題がない、骨粗鬆症に代表される骨病態のモデル動物を提供することにある。

25 本発明者は、上記課題を解決するため、ラット肝臓cDNAライブラリーからレギュカルチンcDNAをクローニングし、レギュカルチン蛋

白質の全長をコードする cDNA を単離し、このラットレギュカルチン全長 cDNA より ORF を切り出し、発現ベクター (pCXN2) に導入し、この遺伝子発現ベクターをラット受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、この受精卵を仮親ラットの卵管に移植し、仔ラットを発生させ、その産仔の組織から DNA を抽出し、PCR 法によってレギュカルチン cDNA が組み込まれているラットを確認したところ、29 匹の産仔からレギュカルチン cDNA を発現するホモ体のラット 5 匹 (雄 4 匹、雌 1 匹) が作出され、かかるトランスジェニックラットの体重の増加が有意に抑制されることを見い出し、本発明を完成するに至った。

- 10 また、本発明者は、外見上何ら骨病態を呈していない上記レギュカルチン遺伝子導入によりレギュカルチン過剰発現能を獲得した形質転換ラットについて、偶々、動物研究用 pQTC (peripheral Quantitative Computed Tomography) 骨密度測定装置による骨の形態学的 (骨密度、骨強度、骨幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さ) 測定評価、及び骨成分の
- 15 生化学的 (カルシウム量、骨芽細胞・造骨細胞のマーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性、骨組織中の細胞数指標である DNA 量) 測定評価を実施したところ、特に大腿骨において形態学的にも生化学的にも、骨量、骨密度の減少による骨吸収 (骨塩溶解) による骨組織の脆弱化、骨形態変化、および尾骨成長遅延などの顕著な骨病態を呈すること
- 20 を見い出し、このレギュカルチン過剰発現病態モデルラットの形質が継代的に安定しており、商業的生産に耐えるものであることを確認し、本発明を完成するに至った。

発明の開示

- 25 すなわち本発明は、レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現することを特徴とするトランスジェニック非ヒト動物 (請

求項 1) や、サイトメガロウイルス－I E エンハンサー、チキン β －アクチンプロモーター、レギュカルチン遺伝子、ラビット β －グロビンポリ A シグナルの順に配列された直鎖 DNA が導入されたことを特徴とする請求項 1 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 2）や、レギュカルチン遺伝子が、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 3）や、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が、配列表の配列番号 1 記載の DNA 配列からなるラットレギュカルチン遺伝子であることを特徴とする請求項 3 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 4）や、ホモ体であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 5）や、体重増加抑制能を有することを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 6）や、大脳機能障害発症性であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 7）や、インスリン非依存性糖尿病発症性であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 8）や、腎性高血圧発症性であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 9）や、尿細管再吸収障害発症性であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 10）や、非ヒト動物がラットであることを特徴とする請求項 1～10 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 11）に関する。

また本発明は、請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物を用いることを特徴とするレギュカルチンの製造方法（請求項 12）や、請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒ

- ト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織，器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項１３）や、
- トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重増加の程度を測定・評価することを特徴とする請求項１３記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項１４）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、大脳機能障害であることを特徴とする請求項１３又は１４記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項１５）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、インスリン非依存性糖尿病であることを特徴とする請求項１３又は１４記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項１６）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、腎性高血圧であることを特徴とする請求項１３又は１４記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項１７）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、尿細管再吸収障害であることを特徴とする請求項１３又は１４記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項１８）や、請求項１３～１８のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬（請求項１９）に関する。

- さらに本発明は、請求項１～１１のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織，器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項２０）や、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニ

ック非ヒト動物における体重減少の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 20 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 21）や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、動脈硬化心筋梗塞であることを特徴とする請求項 20
5 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 22）や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、心筋梗塞であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 23）や、請求項 20～23 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質（請求項 24）に関する。

そしてまた本発明は、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物であって、骨病態を呈することを特徴とする骨病態モデル動物（請求項 25）や、骨組織の脆弱化、骨形態変化、骨成長遅延のいずれか 1 以上の骨病態を呈することを特徴とする請求項 25 記載の骨病態モデル動物（請求
15 項 26）や、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物から、骨の形態学的測定評価及び／又は骨成分の生化学的測定評価により選抜・確認されたことを特徴とする請求項 25 又は 26 記載の骨病態モデル動物（請求項 27）や、骨の形態学的測定評価が、骨密度、骨強度、骨幹部皮質
20 骨厚さ、皮質骨周囲長さのいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 27 記載の骨病態モデル動物（請求項 28）や、骨成分の生化学的測定評価が、カルシウム量、アルカリホスファターゼ活性、骨組織中の DNA 量のいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 27 記載の骨病態モデル動物（請求項 29）や、骨病態の表現形
25 質が継代的に安定していることを特徴とする請求項 25～29 のいずれか記載の骨病態モデル動物（請求項 30）や、レギュカルチンを過剰発

現する非ヒト動物が、レギュカルチン遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物であることを特徴とする請求項 25～30 のいずれか記載の骨病態モデル動物（請求項 31）や、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、ホモ体であることを特徴とする 26～32 のいずれか記載の骨病態モデル動物（請求項 32）や、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、雌の非ヒト動物であることを特徴とする請求項 25～32 のいずれか記載の骨病態モデル動物（請求項 33）や、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、ラットであることを特徴とする請求項 25～33 のいずれか記載の骨病態モデル動物（請求項 34）に関する。

本発明は、また、請求項 25～34 のいずれか記載の骨病態モデル動物に被検物質を投与し、該骨病態モデル動物における骨の形態学的測定評価及び／又は骨成分の生化学的測定評価を行うことを特徴とする骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 35）や、骨の形態学的測定評価が、骨密度、骨強度、骨幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さのいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 35 記載の骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 36）や、骨成分の生化学的測定評価が、カルシウム量、アルカリホスファターゼ活性、骨組織中の DNA 量のいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 35 記載の骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 37）や、骨病態が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項 35～37 のいずれか記載の骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 38）や、請求項 35～38 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる骨病態の予防・治療薬（請求項 39）に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のトランスジェニックラット作製用発現ベクター構築における、ラットレギュカルチン全長cDNAよりORF部分を切り出す過程を示す図である。

5 第2図は、本発明のトランスジェニックラット作製用発現ベクター構築における、ラットレギュカルチン全長cDNAのORF部分を発現ベクターpCXN2に導入する過程を示す図である。

第3図は、本発明のトランスジェニックラット作製用のリニアライズされた導入遺伝子断片調製の過程を示す図である。

10 第4図は、本発明のトランスジェニックラット中のレギュカルチン遺伝子のPCRによる確認におけるプライマーの位置を示す図である。

第5図は、動物研究用pQTC骨密度測定装置を用いた、本発明の骨病態モデルラットの大腿骨組織（骨幹端部及び骨幹部）のスキャンの結果を示す図である。

15 第6図は、動物研究用pQTC骨密度測定装置を用いた、対照のSD系野生型正常ラットの大腿骨組織（骨幹端部及び骨幹部）のスキャンの結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

20 本発明のトランスジェニック非ヒト動物としては、レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、ここで、レギュカルチンを過剰発現するとは、野生型の非ヒト動物のレギュカルチン発現量に比べて有意に多量のレギュカルチンを発現することをいう。また、上記非ヒト動物としては、ラット、マウス、ウシ、ブタ、ニワトリ、カエル、ヒト、イヌ、ウサギ
25 等を挙げることができるが、中でもラットが好ましい。モデル動物としてよく用いられているマウスでは臓器が小さく病態の解析には限界があ

ることもあるが、例えば血圧測定などラットにおいてはこれが可能になり、病態解明や遺伝子治療のための動物実験的手段としてきわめて有用となる。

5 本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、サイトメガロウイルス－I Eエンハンサー，チキン β －アクチンプロモーター，レギュカルチン遺伝子，ラビット β －グロビンポリAシグナルの順に配列された直鎖DNAが導入されたトランスジェニック非ヒト動物を挙げることができる。例えば、マーカー遺伝子，サイトメガロウイルス－I Eエンハンサー，チキン β －アクチンプロモーター，cDNA挿入
10 サイト，ラビット β －グロビンポリAシグナル等を有する発現ベクター（pCXN2）にレギュカルチン全長cDNAを導入したものをを用いると、効率よくトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、レギュカルチン遺伝子が、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列から
15 なるタンパク質をコードする遺伝子であるトランスジェニック非ヒト動物、特に、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が、配列表の配列番号1記載のDNA配列からなるラットレギュカルチン遺伝子であるトランスジェニック非ヒト動物を挙げることができるが、レギュカルチン遺伝子の由来としては、ラットの
20 他、マウス，ウシ，ブタ，ニワトリ，カエル，ヒト，イヌ，ウサギ等特に制限されるものではない。

また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、ホモ体であるトランスジェニック非ヒト動物を挙げることができる。かかる変異染色体をホモに有するホモ体は、染色体をヘテロに有するラッ
25 ト等の非ヒト動物同士を交配することにより得ることができ、レギュカルチン発現量がヘテロ体よりも多いことから、実験モデル動物として特

に好ましい。また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物として、体重の増加が野生型の非ヒト動物に比べて有意に抑制された、すなわち体重増加抑制能を有するトランスジェニック非ヒト動物を好適に挙げる
5 ことができる。レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰
発現するトランスジェニック非ヒト動物が、かかる体重増加抑制能を有
することは全く予想できなかったことであり、この新たな知見はレギュ
カルチンが肥満防止剤としての有用性をもつ可能性があることを示唆し
ている。かかる新たな知見からして、本発明のトランスジェニック非ヒ
ト動物は、レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発
10 現することを特徴とする体重増加抑制能を有するトランスジェニック非
ヒト動物ということもできる。

また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、
大脳機能障害発症性、インスリン非依存性糖尿病発症性、腎性高血圧発
症性、尿細管再吸収障害発症性等のレギュカルチン過剰発現に起因する
15 症状や疾病のうち少なくとも1以上の症状や疾病を発現するトランスジ
ェニック非ヒト動物を挙げる
ことができる。大脳機能障害は、大脳の記憶維持メカニズム上必要とされるCa²⁺-カルモジュリン依存性タンパク
質リン酸化酵素の活性化を、過剰発現したレギュカルチンが抑制して、
神経細胞内の神経伝達を制御することにより発症するものと考えられ、
20 本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、記憶などの大脳機能の障害
(アルツハイマー等の痴呆症)の実験モデル動物として有用である。ま
た、レギュカルチンは、肝臓や腎臓において発現し、ホルモンの細胞内
情報伝達の制御を行っており、レギュカルチンの過剰発現により、肝臓
と腎臓の機能を調節するホルモンの作用発現が障害され、肝臓において
25 は、インスリンの働きを抑制することからインスリン非依存性糖尿病を
誘発し、腎臓においては、レニン-アンジオテンシン系に関係した腎性

高血圧、さらに電解質代謝に関連した尿細管再吸収障害を誘発するものと考えられ、本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、インスリン非依存性糖尿病、腎性高血圧、尿細管再吸収障害等の実験モデル動物として有用である。

- 5 本発明の体重増加抑制能を有するモデルラット等のモデル動物の樹立方法としては、公知のトランスジェニック動物の作製方法(例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384,1980)を用いた方法を挙げることができる。例えば、レギュカルチン(RC)トランスジェニックラットを創製する方法としては、ラット肝臓cDNAライブラリーからレギュカルチンのcDNAをクローニングし、レギュカルチンタンパク質の全長をコードするcDNAを単離後、オープンリーディングフレーム(ORF)を切り出し、発現ベクターに導入し、この遺伝子発現ベクターをリニアライズした導入遺伝子を含む直鎖DNAフラグメントをラット受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、この受精卵あるいは2細胞期胚を仮親ラットの卵管に移植し、仔ラットを発生させ、その産仔の組織から抽出したDNAを用いてPCR法等により、レギュカルチンcDNAが組み込まれていることを確認する方法等を挙げることができる。
- 10
- 15

- 本発明のレギュカルチンの製造方法としては、本発明のトランスジェニック非ヒト動物、好ましくはホモ体のトランスジェニック非ヒト動物を用いる方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、ホモ体のレギュカルチントランスジェニックラットから肝臓を取り出し、そのホモジネートから文献(Chem. Pharm. Bull. 26, 1915-1918, 1978)記載の方法に準じて、レギュカルチンを単離・精製することができる。また、レギュカルチンの増収を目的として、トランスジェニック非ヒト動物にカルシウム、カルチトニン、インスリン、エストロゲン等を投与することもできる。
- 20
- 25

本発明のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法としては、本発明のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、上記レギュカルチン過剰発現に起因する疾病としては、大脳機能障害、インスリン非依存性糖尿病、腎性高血圧、尿細管再吸収障害等を例示することができる。上記トランスジェニック非ヒト動物と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を直接投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重増加の程度や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病の程度を測定・評価する方法や、被検物質投与後のトランスジェニック非ヒト動物から得られる組織、器官又は細胞におけるレギュカルチンの発現抑制量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。また、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞を被検物質の存在下で培養し、該組織、器官又は細胞のレギュカルチンの発現抑制量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。

上記組織や器官としては、肝臓、腎臓尿細管、心臓、大脳等を、細胞としてはこれら組織や器官を構成する肝細胞、神経細胞等を具体的に挙げることができる。また、これらのスクリーニングに際して、野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物における場合と比較・評価することが、個体レベルで正確な比較実験をすることができることから好ましい。このように、上記本発明のスクリーニング方法によると、レギュ

カルチン過剰発現に起因する疾病、例えば大脳機能障害、インスリン非依存性糖尿病、腎性高血圧、尿細管再吸収障害等の予防・治療薬をスクリーニングすることができ、かかるスクリーニング方法により得られるレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬も本発明の範疇に含まれる。

本発明のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法としては、本発明のトランスジェニック非ヒト動物又はトランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、レギュカルチン発現低下に起因する疾病としては、動脈硬化、心筋梗塞等を例示することができる。上記トランスジェニック非ヒト動物と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を直接投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重減少の程度や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病の程度を測定・評価する方法や、被検物質投与後のトランスジェニック非ヒト動物から得られる組織、器官又は細胞におけるレギュカルチンの発現増加量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。また、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞を被検物質の存在下で培養し、該組織、器官又は細胞のレギュカルチンの発現増加量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。

上記組織や器官としては、肝臓、腎臓尿細管、心臓、大脳等を、細胞としてはこれら組織や器官を構成する肝細胞、神経細胞等を具体的に挙

げることができる。また、これらのスクリーニングに際して、野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物における場合と比較・評価することが、個体レベルで正確な比較実験をすることができることから好ましい。このように、上記本発明のスクリーニング方法によると、レギュカルチン発現低下に起因する疾病、例えば動脈硬化、心筋梗塞等の原因物質をスクリーニングすることができ、かかるスクリーニング方法により得られるレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質は、レギュカルチンの生体内における作用・役割をより一層明らかにする上で有用であり、また、これら原因物質に結合する物質等その作用を阻害する物質をスクリーニングすることにより、レギュカルチン発現低下に起因する疾病の予防・治療薬を開発することができる可能性があることからしても有用であり、かかる原因物質も本発明の範疇に含まれる。

次に、本発明の骨病態モデル動物としては、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物であって、骨病態を呈するモデル動物であれば特に制限されるものではなく、かかる骨病態モデル動物として、レギュカルチン遺伝子が導入された上述の本発明のトランスジェニック非ヒト動物を好適に例示することができる。したがって、以下本発明の骨病態モデル動物や骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法について説明するが、より詳細には、上述の本発明のトランスジェニック非ヒト動物に関する記載や、本発明のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法等に関する記載を参照することができる。なお、本発明において、骨病態とは、骨粗鬆症に代表されるカルシウム骨代謝異常等により、骨量の減少、骨組織の脆弱化、骨形態変化、骨成長遅延等の骨やその成長が正常でない状態をいう。

上記本発明の骨病態モデル動物としては、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物から、骨の形態学的測定評価、例えば骨密度、骨強度、骨

幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さのいずれか 1 以上の測定評価、及び／又は、骨成分の生化学的測定評価、例えばカルシウム量、アルカリホスファターゼ活性、骨組織中の DNA 量のいずれか 1 以上の測定評価により選抜・確認された、骨組織の脆弱化、骨形態変化、骨成長遅延のいずれか 1 以上の骨病態を呈する骨病態モデル動物が好ましく、上記骨の形態学的測定評価には、動物研究用 p Q T C (peripheral Quantitative Computed Tomography) 骨密度測定装置 (Bone Vol.29, No.2, August 2001; 101-104) を特に有利に用いることができる。また、骨成分の生化学的測定評価は、後述する実施例に記載されているような、この分野における常法により実施することができる。なお、骨の形態学的測定評価や骨成分の生化学的測定評価には、大腿骨等の骨自体が必要な、供試動物をそのまま骨病態モデル動物として使用できないことから、上記選抜・確認された骨病態モデル動物とは、骨の形態学的測定評価や骨成分の生化学的測定評価に供した動物と同腹の動物又はその子孫をいう。

15 本発明の骨病態モデル動物は、例えば前記のように、本発明者が作製したラットレギュカルチン発現ベクターから切り出され、リニアライズされた DNA フラグメントを別途調整した受精卵卵胞細胞にマイクロインジェクション法で注入し、卵細胞を培養後、発生が進み異常が認められない胚を仮親の卵管内に移植し、生まれた産仔について、特に動物研究用 p Q T C 骨密度測定装置による骨の形態学的測定評価、及び骨成分の生化学的測定評価の結果を行うことにより、選抜・確認することができ、これらの中でも、骨病態の表現形質が継代的に安定し、商業的生産に適したものが好ましい。また、本発明の骨病態モデル動物としては、ホモ体であるレギュカルチントランスジェニック骨病態モデル動物を好ましく例示することができる。かかる変異染色体をホモに有するホモ体は、染色体をヘテロに有するラット等の非ヒト動物同士を交配すること

により得ることができ、レギュカルチン発現量がヘテロ体よりも多いことから、骨変化等の骨病態の表現形質がより強く現れることから好ましい。さらに、本発明の骨病態モデル動物としては、レギュカルチン遺伝子がX染色体上にあり、雄よりも雌において骨変化等の骨病態の表現形質がより顕著に現れることから、雌ラット等の雌の骨病態モデル動物を好ましく例示することができる。

本発明の骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法としては、上記本発明の骨病態モデル動物に被検物質を投与し、該骨病態モデル動物における骨の形態学的測定評価及び／又は骨成分の生化学的測定評価を行うことを特徴とするスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、被検物質としては、公知の合成化合物、ペプチド、蛋白質などの他に、例えば哺乳動物の組織抽出物、細胞培養上清などや、各種植物の抽出成分等が用いられる。例えば、被検化合物を本発明の骨病態モデル動物に経口的又は非経口的に投与し、該骨病態モデル動物における、例えば骨密度、骨強度、骨幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さ等の骨の形態学的測定評価や、例えばカルシウム量、アルカリホスファターゼ活性、骨組織中のDNA量等の骨成分の生化学的測定評価を実施することにより、骨粗鬆症等の骨病態の予防・治療薬をスクリーニングすることができる。また、これらのスクリーニングに際して、野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物における場合と比較・評価することが、個体レベルで正確な比較実験をすることができることから好ましい。

また、本発明の骨病態の予防・治療薬としては、上記本発明のスクリーニング方法により得られる骨病態の予防・治療薬であれば特に制限されるものではなく、これら予防・治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用

配合成分を添加することができる。これら予防・治療薬を用いる、骨粗鬆症等の骨病態の予防・治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量の上記予防・治療薬を、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、

5 顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

10

実施例 1 [ラット R C c D N A 調製]

(R N A の調製)

ウイスター系雄性ラット（3 週齢）から肝臓を摘出し、グアニジニーソチオシアネート液（4 M グアニジニウムチオシアネート，25 mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0），0.5 % サルコシル，0.1 M 2-メルカプトエタノール，2 M 酢酸ナトリウム）でホモジナイズした。これをフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール混液で抽出し、4℃、10,000×g で 20 分遠心した。水層にイソプロパノールを加え、-20℃で放置し、RNA を沈澱させた。回収した沈澱はジエチルピロカーボネート処理した 0.5 % ドデシル硫酸ナトリウムに溶解した。これをオリゴ（dT）セルロースカラムに通し、ポリ（A）+RNA を精製した。

15

20

(c D N A ライブラリーの作製)

精製したポリ（A）+RNA（5 μg）に 50 unit の Moloney-Murine Leukemia ウイルス逆転写酵素とオリゴ（dT）18 プライマー

25

リンカーを添加し、1本鎖cDNAを合成した。さらに合成した1本鎖cDNAに大腸菌リボヌクレアーゼHとDNAポリメラーゼIを添加し、2本鎖cDNAを合成した。これにEcoRIアダプターを付加し、XhoI, EcoRIで消化したファージ発現ベクター(λZAPII)と連結した。さらにパッケージングエキストラクトを用いてファージにパッケージングしcDNAライブラリーのファージを作製した。

(RC cDNAクローンの選抜)

ラット肝のcDNAライブラリーのファージ約 1×10^6 個を大腸菌と混合し20個の寒天プレートに植菌した。42℃で3時間半インキュベートした後、プレートに10mM イソプロピルチオβ-D-ガラクトシドで処理したニトロセルロース膜をのせ、37℃で3時間半インキュベートした。ニトロセルロース膜はブロッキングした後、抗RCウサギ血清(×200)と室温で2時間インキュベートした。膜は洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体を加えインキュベートした。これを発色液(0.35mM ニトロブルーテトラゾリウム, 0.4mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート)に浸し発色させ、RC cDNA陽性プラークを同定した。

(プラスミドベクターへのサブクローニング)

ファージベクターλZAPIIは、その配列中にプラスミドベクターであるpBluescriptの塩基配列を含み、λZAPIIにクローニングされたRCのcDNA断片はこのpBluescriptに挿入されている。また、pBluescriptの両端にはヘルパーファージの複製開始点と終結点が存在している。そこで同定したプラークよりファージを単離し、R408ヘルパーファージとともに大腸菌SUREに感染させ、RCのcDNA断片を含むpBluescriptを大腸菌内で合成させ、ヘルパーファージの形で大腸菌体外に放出させた。このファージ液をさらに大腸菌SUREに感染させ、

RCのcDNA断片を有するプラスミドとして菌内で複製させた。この大腸菌を50 μ g/mlアンピシリン含有のLBプレートに植菌し、アンピシリン耐性コロニーを選択した。

(cDNAインサートの塩基配列の決定)

- 5 Sequenase システム (US Biochemical 社製) を用いて cDNA インサートの全塩基配列を決定した。すなわちプラスミドDNAをEcoRIで切断し、断片はアルカリ変性処理した後、プライマーを加えアニーリングした。これに35S dCTP、0.1M DTT、Sequenase 用酵素液を添加した後4等分し、各々にddATP、ddGTP、ddTTP、
10 ddCTPを加え、37℃5分間インキュベートした。これらはアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーを行ない、塩基配列を読み取った。配列番号1にレギュカルチンcDNAの全塩基配列を示す。また、得られたアミノ酸配列も配列番号2に示す。これから計算されるレギュカルチンの分子量は33,388であった。この値は
15 精製したレギュカルチンをSDSポリアクリルアミド電気泳動法により算出した分子量と一致した。

実施例2 [トランスジェニックラットの創製]

(導入遺伝子の構築)

- 20 実施例1で得られたラットレギュカルチン全長cDNAを含むプラスミド、RC-900 (glycerol stock; RC-F)、ベクターpBluescript SK(-)より、ORF全てを含むDNA断片をPstIを用いて切り出した(図1A)。この切り出したPstIフラグメントをpBluescript II KS(+)のPstIサイトに組み込んだ(図1B)。次にEcoRIで切り出し、得られたEcoRIフラグメント(図2A)を、発現ベクターpCXN2(クロンテック社)(Gene 108, 193-199, 1991)のEcoRIサイトに導入し(図2B)、
25 ラットレギュカルチン発現ベクターRC/pCXN2を調製した。この

RC/pCXN2 を SalI と SfiI と MluI で切断し、リニアライズされた 3.6 kbp のフラグメントを得た (図 3)。

(トランスジェニックラットの作製)

ラットの前核期受精卵への上記リニアライズされた 3.6 kbp の DNA フラグメント溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で実施した。4 週齢のスプラーグドーリー (SD, Sprague-Dawley) 系雌ラットを明暗サイクル 12 時間 (明時間 4:00 ~ 16:00)、温度約 23℃、湿度約 55% で飼育し、膣スメア法により雌の性周期を観察してホルモン処理日を選択した。雌ラットに 150 IU/kg の妊馬血清性腺刺激ホルモン (日本全薬社製「PMS ゼンヤク」) を腹腔内投与して過剰排卵処理を行い、その 48 時間後に 150 IU/kg のヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (三共エール薬品 (株) 社製「プベローゲン」) を腹腔内投与した後、雄との同居により交配を行わせ、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン投与 32 時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。

この様にして調製したウイスターラットの受精卵の雄性前核に、前記 3.6 kbp の DNA フラグメント溶液 (5 ng/ μ l 濃度) を顕微注入した。DNA フラグメントが注入された卵を、CO₂ インキュベーター内で m-KRB (m-クレブスリンガー緩衝液) 培地を用いて 1 晩培養した。翌日 2 細胞へと発生が進み、異常の認められない 2 細胞期胚を 9 匹の仮親 (精管結紮雄と交配させた偽妊娠雌ラット) の卵管内に 1 匹あたり 20 ~ 30 個程度を移植し、29 匹の産仔を得た。4 週齢まで生存した 27 匹の産仔の尾より DNA を採取し、採取した DNA をプライマー huRC-1; GGAGGCTATGTTGCCACCATTTGGA (配列番号 3)、プライマー huRC-2; CCCTCCAAAGCAGCATGAAGTTG (配列番号 4) を用いて PCR 法により検定した (図 4)。その結果、合計 5 匹 (雄 4 匹、雌 1 匹) のラットに導入遺伝子の存在を確認した。そのうち 5 匹が次世

代に導入遺伝子を伝えた。

実施例 3 [体重増加抑制能]

実施例 2 で得られたトランスジェニックラット（ヘテロ体）の系統の内、尾組織におけるレギュカルチン発現量が最も多い系統同士を交配することにより、トランスジェニックラット（ホモ体）を得た。また、ホモ体であることは、ラット尾組織より抽出したゲノム DNA への導入遺伝子の組み込みを PCR 法にて確認し、ヘテロ体の cDNA 量の 2 倍以上の組み込み量を検出することにより確認した。かかるホモ体のトランスジェニックラットを用いて体重増加抑制能について調べた。3～4 週齢の野生型 SD ラットとトランスジェニックラット（ホモ体）それぞれ 8 匹ずつの体重の平均値を表 1 に示す。Student's t test, $P < 0.01$ 、平均値 ± 標準誤差で表し有意差が認められ、レギュカルチン遺伝子の過剰発現により、体重増加が抑制されることを確認することができた。

（表 1）

	体重 (g)
野生型	88.5 ± 3.8
トランスジェニック	$69.5 \pm 2.4^*$

実施例 4 [骨病態モデル動物]

（SD 系ホモタイプ骨病態モデルラット）

実施例 2 で得られたトランスジェニックラット（ヘテロ体）の系統の内、尾組織におけるレギュカルチン発現量が最も多い系統同士を交配することにより、トランスジェニックラット（ホモ体）を得た。また、ホモ体であることは、ラット尾組織より抽出したゲノム DNA への導入遺伝子の組み込みを PCR 法にて確認し、ヘテロ体の cDNA 量の 2 倍以上の組み込み量を検出することにより確認した。外見上骨病態を呈していない上記ホモ体のトランスジェニックラットの中から、継体的に安定

して生存している雌雄のラットを、試験区のSD系骨病態モデルラット（ホモ体）として用い、骨の形態学的測定評価（骨密度、骨強度、骨幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さ）と骨成分の生化学的測定評価（カルシウム量、骨芽細胞・造骨細胞のマーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性、骨組織中の細胞数指標であるDNA量）を行った。また、対照区として雌雄のSD系野生型正常ラットを用いた。なお、各測定評価において、試験区・対照区とも、ラットは各群5匹を使用し、各測定値は平均値±標準誤差で示し、統計的有意差検出は、Student's t-testを用いて行い、 $P < 0.01$ （1%）以下を有意差ありとした。

10 （骨の形態学的測定評価）

5～6週齢の雌雄のSD系骨病態モデルラット（試験区）及びSD系野生型正常ラット（対照区）をエーテル麻酔下で解剖して大腿骨組織を摘出後、筋肉組織を除去し、所定の測定に供するまで70%エタノール溶液中に完全に浸して保存したものを標本とした。この標本を動物研究用pQTC骨密度測定装置（XCT Reserch SA+：Stratec Medizintechnik GmbH Pforzheim Germany）を用いて、骨幹端部においては遠位骨端（成長軟骨板）から2.0mmの部位よりスライス幅0.5mmずつで5箇所のスキャンを行った。また、骨長の約1/2の部位を骨幹部とし、1ヶ所スキャンを行った。スキャンの結果を図5（試験区；上段及び中段が骨幹端部、下段左が骨幹部）と図6（対照区；上段及び中段が骨幹端部、下段左が骨幹部）に示す。スキャン後、各群骨幹部と骨幹端部の骨密度、骨強度、骨幹部組織の皮質骨厚、及び骨幹部組織の皮質骨外膜周囲長が自動的に算出・表示された。結果をそれぞれ表2～表5に示す。なお、表6に、上記pQTC測定における測定パラメーターと解析パラメーターを示す。

pQTC測定の結果、雄雌とも正常ラットと比較して骨病態モデルラ

ットでは骨密度が減少し、特に雌において顕著であった（表 2）。骨強度においては、雄の正常ラットと比較して雄の骨病態モデルラットでは骨強度が減少していたが、雌においては骨幹部、骨幹端部ともに骨病態モデルラットで骨強度が正常ラットの約 40～45%にまで減少することが明らかになった（表 3）。骨幹部（皮質骨）組織の皮質は、雄雌共に、正常ラットと比較して骨病態モデルラットで皮質骨厚が有意に減少していた（表 4）。骨幹部（皮質骨）組織の皮質外膜周囲長は、雄においては 2 群間で有意な差は認められなかったが、雌においては、正常ラットと比較して骨病態モデルラットで皮質外膜周囲長が有意に減少した（表 5）。

10 (表 2) 骨組織の骨密度 (mg/cm^3)

		骨 幹 部 (mg/cm^3)	骨 幹 端 部 (mg/cm^3)
オス	野生型	494.3 ± 12.94	345.8 ± 12.25
	トランスジェニック	$425.0 \pm 31.28^*$	$304.4 \pm 19.69^*$
メス	野生型	465.8 ± 15.05	388.0 ± 18.77
	トランスジェニック	$215.0 \pm 5.38^*$	$274.6 \pm 7.82^*$

(表 3) 骨組織の骨強度 (mm^3)

		骨 幹 部 (mm^3)	骨 幹 端 部 (mm^3)
オス	野生型	2.794 ± 0.127	3.426 ± 0.077
	トランスジェニック	2.368 ± 0.308	3.012 ± 0.394
メス	野生型	2.446 ± 0.063	3.194 ± 0.102
	トランスジェニック	$1.163 \pm 0.029^*$	$1.298 \pm 0.108^*$

(表 4) 骨幹部（皮質骨）組織の皮質骨厚 (mm)

		骨 幹 部 (mm)
オス	野生型	0.309 ± 0.012
	トランスジェニック	$0.112 \pm 0.016^*$
メス	野生型	0.337 ± 0.012
	トランスジェニック	$0.257 \pm 0.040^*$

(表5) 骨幹部(皮質骨)組織の皮質骨外膜周囲長(mm)

		骨幹部(mm)
オス	野生型	9.365±0.183
	トランスジェニック	9.540±0.175
メス	野生型	9.004±0.096
	トランスジェニック	8.761±0.234*

(表6) 測定パラメーター及び測定部位

スライス厚	500 μ m	レファレンスの位置	SV画像から大腿骨遠端部を指定
ボクセルサイズ	80 μ m	測定部位: 骨幹部部(海綿骨)	遠位骨端より 2.0mmから 0.5mmごとに計5スライス
	80 μ m	測定部位: 骨幹部(皮質部)	骨長の約1/2の部位
測定時間		1検体当たり約7分	(SVスキャン含む)

5

解析パラメーター

CALCBD				CORTBD (SSI)	
カウンターモード:2		ピールモード:2		コルチカルモード:1	
スレシホルト:	---	トラベキュラエリア:	---	スレシホルト:	690/(&464)mg/cm ³
		スレシホルト:	395mg/cm ³	インナーズレシホルト:	

(骨成分の生化学的測定評価)

5～6週齢の雌雄のSD系ホモタイプ骨病態モデルラット(試験区)

- 10 及びSD系野生型正常ラット(対照区)をエーテル麻酔下で解剖して大腿骨組織を摘出後、筋肉組織を除去し、所定の測定に供するまで70%エタノール溶液中に完全に浸して保存したものを標本とした。この標本から、骨幹部(皮質骨)と骨幹部部(海綿骨)に分けて、カルシウム量、骨芽細胞・造骨細胞のマーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性、
- 15 骨組織中の細胞数指標であるDNA量の測定を行った。

骨組織中のカルシウム量(mg/g骨乾燥重量)の測定は、骨幹部(皮質骨)と骨幹部部(海綿骨)を、それぞれ640℃で24時間灰化し、

重量を測り、その後 6 N 塩酸に溶解して骨カルシウム量を原子吸光度にて測定した。骨組織中のカルシウム量を mg / g 骨乾燥重量で表した結果を表 7 に示す。表 7 からわかるように、雄雌とも正常ラットと比較して骨病態モデルラットでは骨カルシウム量が有意に減少していたが、
5 特に雌において骨カルシウム量の減少が顕著であった。

(表 7) 骨組織中カルシウム量 (mg / g 骨乾燥重量)

		骨幹部	骨幹端部
オス	野生型	217.6 ± 4.47	169.1 ± 3.99
	トランスジェニック	$192.0 \pm 7.89^*$	$142.5 \pm 2.46^*$
メス	野生型	219.4 ± 3.51	185.4 ± 8.55
	トランスジェニック	$174.4 \pm 4.69^*$	$137.3 \pm 8.54^*$

骨組織中のアルカリ性ホスファターゼ活性の測定は、骨幹部（皮質骨）と骨幹端部（海綿骨）を、それぞれ氷冷した 6.5 mM パルビタール緩衝液（pH 7.4）3 ml に浸し、小片にカットし、テフロン乳棒のついた Potter-Elvehjem ホモジナイザーにて均質とし、超音波装置にて 60 秒間かけて破壊した。600 rpm にて 5 分間遠心分離し、得られた上清を酵素活性の測定に使用した。アルカリ性ホスファターゼ活性は
10 Walter と Schutt の方法（Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, Vol.1-2, Academic Press, New York, PP856-860, 1965）に準
15 じて測定した。また、タンパク質の濃度は Lowry らの方法（J. Biol. Chem., 193, 265-273, 1951）に準じて測定した。骨組織中のアルカリ性
ホスファターゼ活性を遊離した p-ニトロフェノールの $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ 蛋白質として表した結果を表 8 に示す。表 8 から、正常ラット
20 と比較して骨病態モデルラットでは、骨幹部（皮質骨）においては雄でアルカリ性ホスファターゼ活性が有意に上昇しており、また骨幹端部（海綿骨）においては雌でアルカリ性ホスファターゼ活性が有意に上昇していた。

(表 8) 骨組織中アルカリ性ホスファターゼ活性

($\mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 蛋白質)

		骨幹部	骨幹部端部
オス	野生型	1.467 \pm 0.072	1.246 \pm 0.038
	トランスジェニック	1.104 \pm 0.093*	1.204 \pm 0.038
メス	野生型	1.192 \pm 0.076	1.355 \pm 0.029
	トランスジェニック	1.067 \pm 0.095	1.107 \pm 0.011*

骨組織中のDNA量の測定は、骨幹部（皮質骨）と骨幹部端部（海綿骨）を、それぞれ氷冷した6.5 mM パルピタール緩衝液（pH 7.4）3 ml に浸し、小片にカットした後、氷冷した0.1 N 水酸化ナトリウム溶液4.0 ml にて24時間振り混ぜた。アルカリ抽出後、10,000 rpm で5分間遠心分離し、得られた上清をDNA量の測定に使用した。DNA量はCeriottiの方法（J. Biol. Chem., 214,39-77,1955）に準じて測定した。骨組織中のDNA量をmg/g 骨組織湿重量として表した結果を表9に示す。表9から、正常ラットと比較して骨病態モデルラットでは、骨幹部（皮質骨）においては雌でDNA量が有意に減少しており、また骨幹部端部（海綿骨）においては雌雄ともにDNA量が有意に減少していた。

(表 9) 骨組織中DNA量 (mg/g 骨組織湿重量)

		骨幹部	骨幹部端部
オス	野生型	2.55 \pm 0.13	4.64 \pm 0.29
	トランスジェニック	2.99 \pm 0.24	3.19 \pm 0.22*
メス	野生型	2.40 \pm 0.31	4.39 \pm 0.40
	トランスジェニック	1.26 \pm 20.18*	2.37 \pm 0.38*

以上のように、本発明の骨病態モデル動物においては、大腿骨組織の明らかな骨変化が見い出され、この骨変化は、大腿骨の骨幹部（皮質骨）と骨幹部端部（海綿骨）の両部において、形態学的並びに生化学的（骨成分）に認められ、骨組織が骨吸収（骨塩溶解）を引き起こし、骨形成も

障害されていることに基づくことが明らかになった。特に、雄（male）よりも雌（female）において、その骨変化は顕著であった。また、本発明の骨病態モデル動物においては、骨病態の発現形質が継体的に安定していることも確認されている。

5

産業上の利用可能性

- 本発明のレギュカルチントランスジェニック非ヒト動物、特にレギュカルチントランスジェニックラットは、肝障害、腎障害、糖尿病、心筋梗塞、高血圧、アルツハイマーなど Ca^{2+} シグナリングが関与する成人病、生活習慣病、老人病など病態評価用実験モデル動物として有用である。また、レギュカルチンは細胞内 Ca^{2+} シグナリングに関連した細胞機能を調節しており、本発明のレギュカルチントランスジェニック非ヒト動物はかかるレギュカルチンを過剰発現することから、臓器特異的な病態（肝癌、心筋梗塞、大脳痴呆症）の修復・改善のための遺伝子治療薬開発のためのモデル動物として有用な手段になりうる。また、本発明の骨病態モデル動物は、骨粗鬆症等の骨疾患治療のための病態モデル動物として、骨病態機構の解明や新薬の開発を目的とした前臨床試験等に有利に用いることができる。
- 10
- 15

請 求 の 範 囲

1. レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現することを特徴とするトランスジェニック非ヒト動物。
- 5 2. サイトメガロウイルス－I Eエンハンサー，チキン β －アクチンプロモーター，レギュカルチン遺伝子，ラビット β －グロビンポリAシグナルの順に配列された直鎖DNAが導入されたことを特徴とする請求項1記載のトランスジェニック非ヒト動物。
3. レギュカルチン遺伝子が、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列
- 10 からなるタンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項1又は2記載のトランスジェニック非ヒト動物。
4. 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が、配列表の配列番号1記載のDNA配列からなるラットレギュカルチン遺伝子であることを特徴とする請求項3記載のトランス
- 15 ジェニック非ヒト動物。
5. ホモ体であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。
6. 体重増加抑制能を有することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- 20 7. 大脳機能障害発症性であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。
8. インスリン非依存性糖尿病発症性であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。
9. 腎性高血圧発症性であることを特徴とする請求項1～8のいずれか
- 25 記載のトランスジェニック非ヒト動物。
10. 尿細管再吸収障害発症性であることを特徴とする請求項1～9の

いずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

1 1. 非ヒト動物がラットであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 0 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

5 1 2. 請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物を用いることを特徴とするレギュカルチンの製造方法。

1 3. 請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

10 1 4. トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重増加の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 1 3 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

15 1 5. レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、大脳機能障害であることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

1 6. レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、インスリン非依存性糖尿病であることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

20 1 7. レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、腎性高血圧であることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

25 1 8. レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、尿細管再吸収障害であることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

1 9. 請求項 1 3 ～ 1 8 のいずれか記載のスクリーニング方法により得

られるレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬。

20. 請求項1～11のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

21. トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重減少の程度を測定・評価することを特徴とする請求項20記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

22. レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、動脈硬化心筋梗塞であることを特徴とする請求項20又は21記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

23. レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、心筋梗塞であることを特徴とする請求項20又は21記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

24. 請求項20～23のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質。

25. レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物であって、骨病態を呈することを特徴とする骨病態モデル動物。

26. 骨組織の脆弱化、骨形態変化、骨成長遅延のいずれか1以上の骨病態を呈することを特徴とする請求項25記載の骨病態モデル動物。

27. レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物から、骨の形態学的測定評価及び／又は骨成分の生化学的測定評価により選抜・確認されたことを特徴とする請求項25又は26記載の骨病態モデル動物。

28. 骨の形態学的測定評価が、骨密度、骨強度、骨幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さのいずれか1以上の測定評価であることを特徴とする請

求項 2 7 記載の骨病態モデル動物。

2 9. 骨成分の生化学的測定評価が、カルシウム量、アルカリホスファターゼ活性、骨組織中の DNA 量のいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 2 7 記載の骨病態モデル動物。

- 5 3 0. 骨病態の表現形質が継代的に安定していることを特徴とする請求項 2 5 ～ 2 9 のいずれか記載の骨病態モデル動物。

3 1. レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、レギュカルチン遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物であることを特徴とする請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか記載の骨病態モデル動物。

- 10 3 2. レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、ホモ体であることを特徴とする 2 6 ～ 3 2 のいずれか記載の骨病態モデル動物。

3 3. レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、雌の非ヒト動物であることを特徴とする請求項 2 5 ～ 3 2 のいずれか記載の骨病態モデル動物。

- 15 3 4. レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物が、ラットであることを特徴とする請求項 2 5 ～ 3 3 のいずれか記載の骨病態モデル動物。

3 5. 請求項 2 5 ～ 3 4 のいずれか記載の骨病態モデル動物に被検物質を投与し、該骨病態モデル動物における骨の形態学的測定評価及び／又は骨成分の生化学的測定評価を行うことを特徴とする骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法。

20

3 6. 骨の形態学的測定評価が、骨密度、骨強度、骨幹部皮質骨厚さ、皮質骨周囲長さのいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 3 5 記載の骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法。

- 3 7. 骨成分の生化学的測定評価が、カルシウム量、アルカリホスファターゼ活性、骨組織中の DNA 量のいずれか 1 以上の測定評価であることを特徴とする請求項 3 5 記載の骨病態の予防・治療薬のスクリーニン
- 25

グ方法。

38. 骨病態が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項35～37のいずれか記載の骨病態の予防・治療薬のスクリーニング方法。

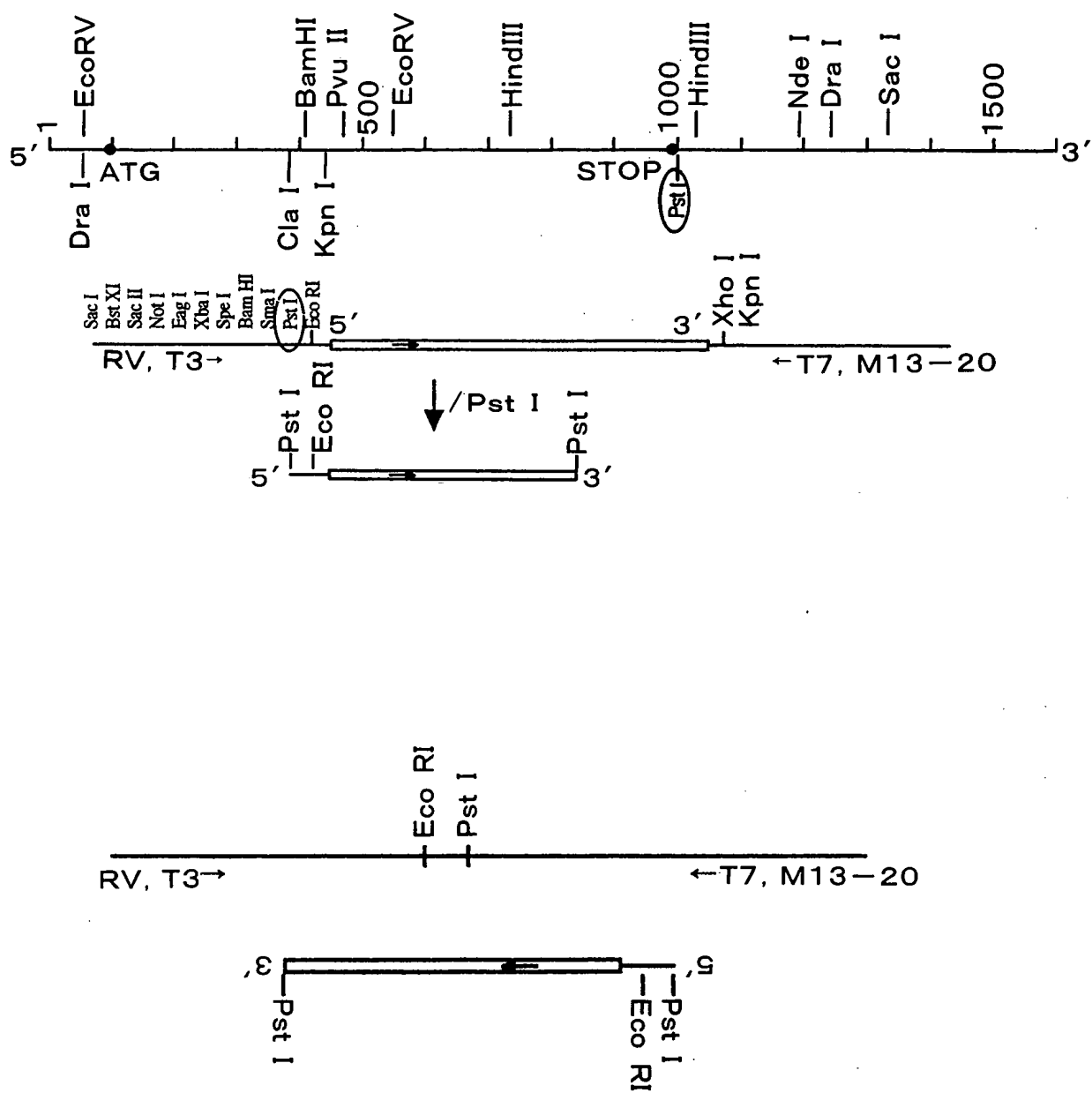
39. 請求項35～38のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる骨病態の予防・治療薬。

5

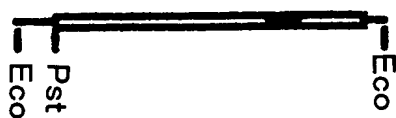
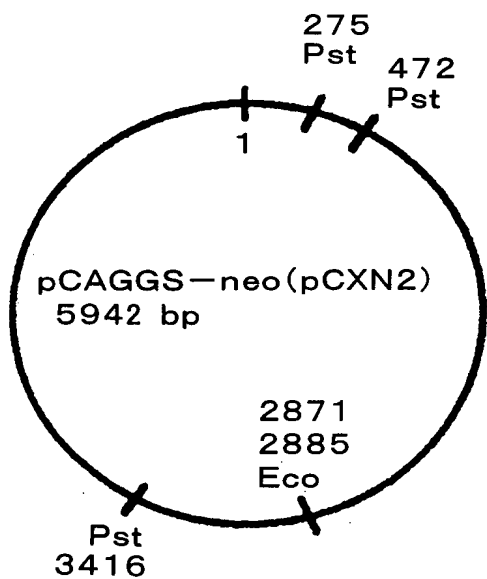
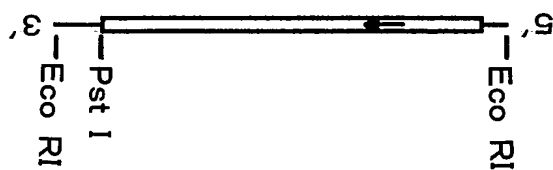
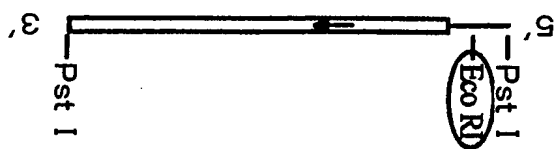
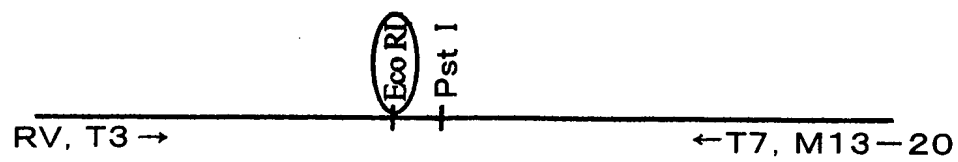
要 約 書

元来高等動物の肝臓等に発現しているレギュカルチンを過剰に発現する、骨粗鬆症に代表される骨病態等のレギュカルチン過剰発現モデル動物を提供するものである。ラット肝臓cDNAライブラリーからレギュカルチンcDNAをクローニングし、レギュカルチン蛋白質の全長をコードするcDNAを単離し、このラットレギュカルチン全長cDNAよりORFを切り出し、発現ベクター（pCXN2）に導入し、この遺伝子発現ベクターをラット受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、この受精卵を仮親ラットの卵管に移植し、仔ラットを発生させ、その産仔からホモ体のラットを作出する。かかるトランスジェニックラットは、形態学的にも生化学的にも顕著な骨病態を呈し、また、体重の増加が有意に抑制される。

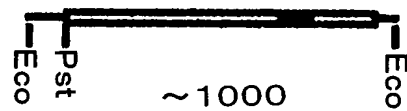
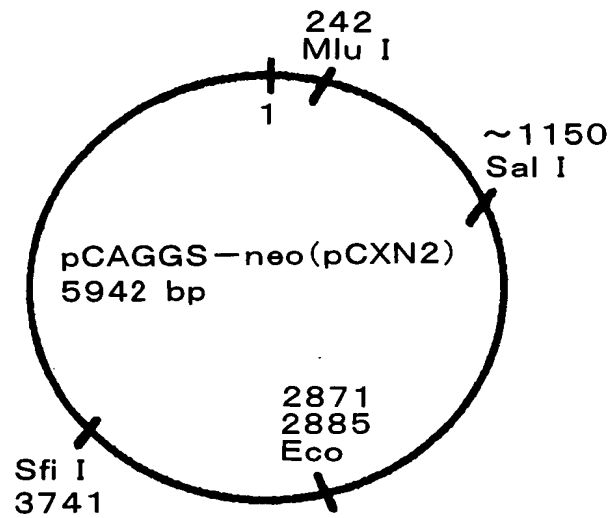
第 1 図



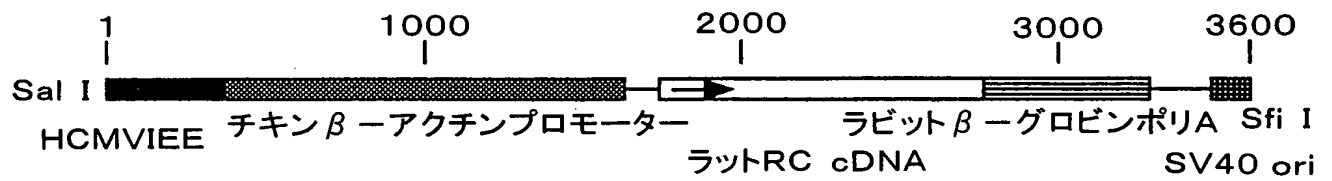
第 2 図



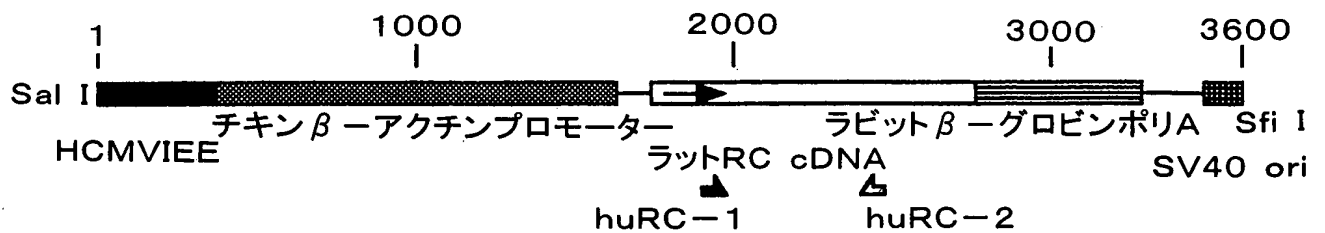
第 3 図



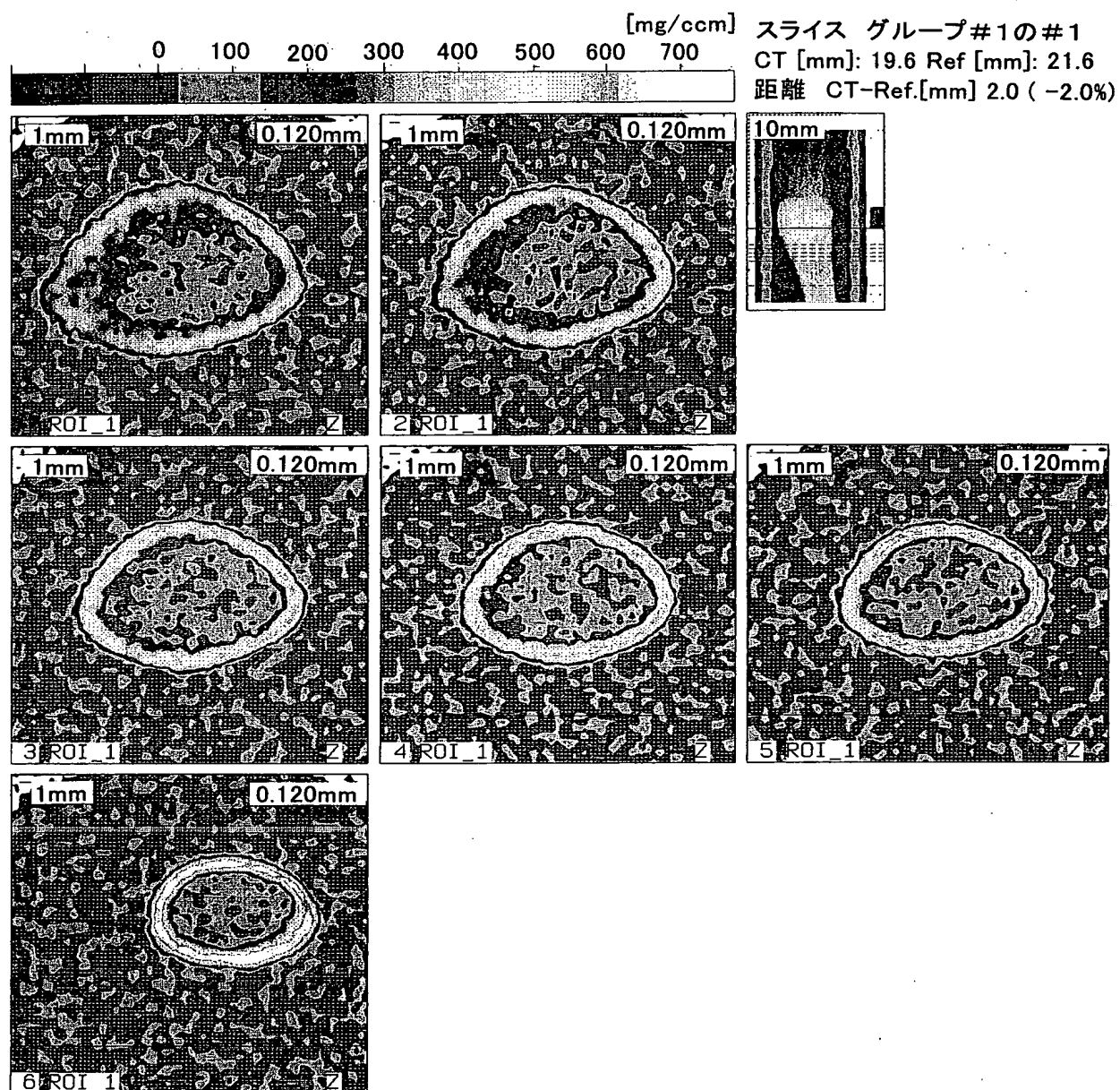
Sal IとSfi IとMlu Iで切断



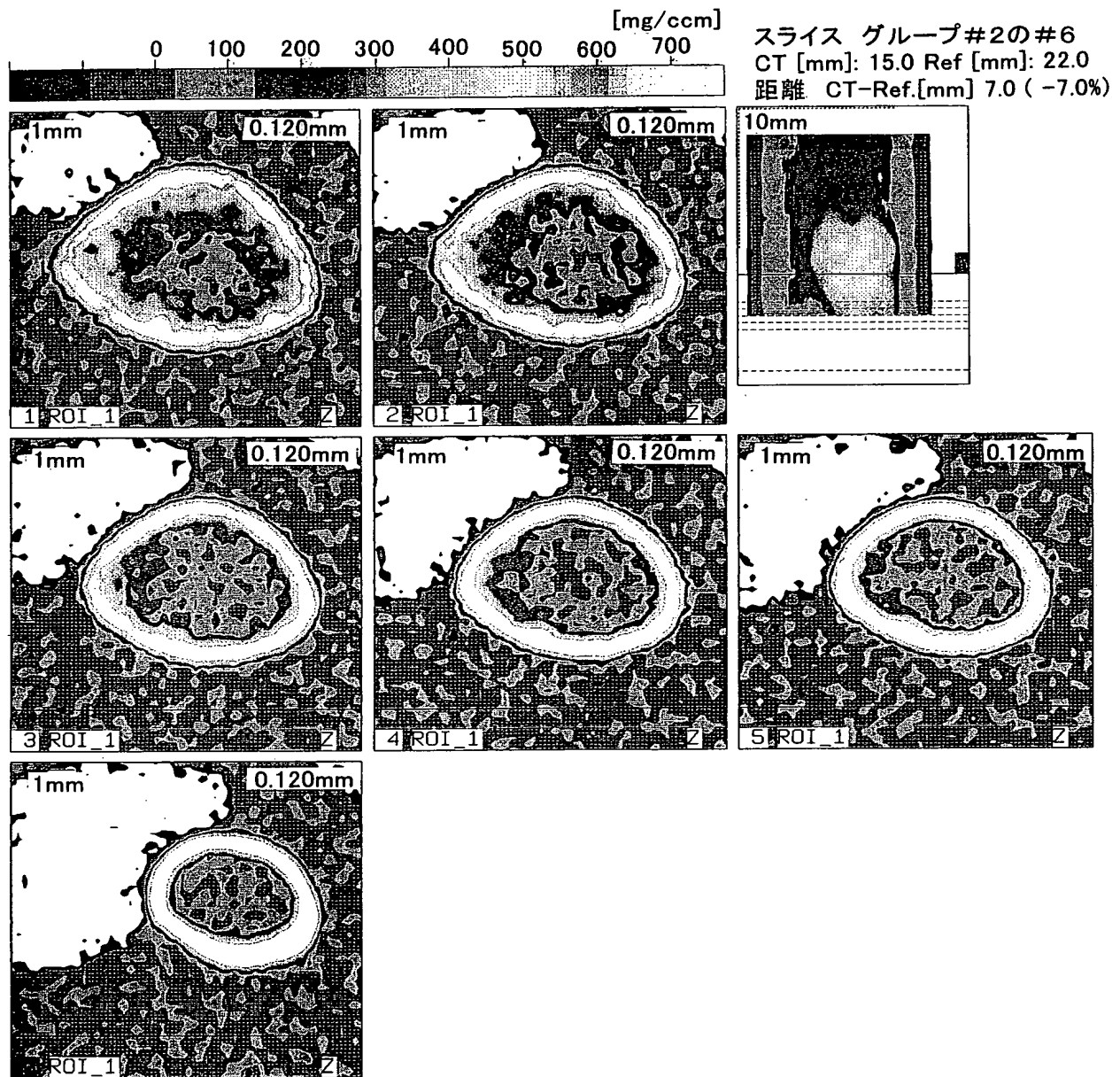
第 4 図



第 5 図



第 6 図



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Regucalcin gene-transferred non-human animals

<130> YG2002-18PCT

<140>

<141>

<150> JP P2001-287698

<151> 2001-9-20

<150> JP P2002-177666

<151> 2002-6-18

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<400> 1

atg	tct	tcc	atc	aag	att	gaa	tgt	gtt	tta	agg	gag	aac	tac	agg	tgt	48
Met	Ser	Ser	Ile	Lys	Ile	Glu	Cys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Arg	Cys	
1				5					10					15		

ggg	gag	tcc	cct	gtg	tgg	gag	gag	gca	tca	aag	tgt	ctg	ctg	ttt	gta	96
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

Gly	Glu	Ser	Pro	Val	Trp	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Cys	Leu	Leu	Phe	Val		
			20					25					30				
gac	atc	cct	tca	aag	act	gtc	tgc	cga	tgg	gat	tcg	atc	agc	aat	cga	144	
Asp	Ile	Pro	Ser	Lys	Thr	Val	Cys	Arg	Trp	Asp	Ser	Ile	Ser	Asn	Arg		
		35					40					45					
gtg	cag	cga	gtt	ggt	gta	gat	gcc	cca	gtc	agt	tca	gtg	gca	ctt	cga	192	
Val	Gln	Arg	Val	Gly	Val	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Arg		
		50				55						60					
cag	tca	gga	ggc	tat	gtt	gcc	acc	att	gga	acc	aag	ttc	tgt	gct	ttg	240	
Gln	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile	Gly	Thr	Lys	Phe	Cys	Ala	Leu		
	65				70				75				80				
aac	tgg	gaa	gat	caa	tca	gta	ttt	atc	cta	gcc	atg	gtg	gat	gaa	gat	288	
Asn	Trp	Glu	Asp	Gln	Ser	Val	Phe	Ile	Leu	Ala	Met	Val	Asp	Glu	Asp		
				85					90				95				
aag	aaa	aac	aat	cga	ttc	aat	gat	ggg	aag	gtg	gat	cct	gct	ggg	aga	336	
Lys	Lys	Asn	Asn	Arg	Phe	Asn	Asp	Gly	Lys	Val	Asp	Pro	Ala	Gly	Arg		
		100						105				110					
tac	ttt	gct	ggt	acc	atg	gct	gag	gaa	acc	gcc	cca	gct	gtt	ctg	gag	384	
Tyr	Phe	Ala	Gly	Thr	Met	Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Glu		
		115					120					125					
cgg	cac	caa	ggg	tcc	ttg	tac	tcc	ctt	ttt	cct	gat	cac	agt	gtg	aag	432	
Arg	His	Gln	Gly	Ser	Leu	Tyr	Ser	Leu	Phe	Pro	Asp	His	Ser	Val	Lys		
		130				135					140						
aaa	tac	ttt	aac	caa	gtg	gat	atc	tcc	aat	ggt	ttg	gat	tgg	tcc	ctg	480	
Lys	Tyr	Phe	Asn	Gln	Val	Asp	Ile	Ser	Asn	Gly	Leu	Asp	Trp	Ser	Leu		
	145				150					155			160				
gac	cat	aaa	atc	ttc	tac	tac	att	gac	agc	ctg	tcc	tac	act	gtg	gat	528	

Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Thr Val Asp	
165	170 175
gcc ttt gac tat gac ctg cca aca gga cag att tcc aac cgc agg act	576
Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Pro Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Thr	
180	185 190
gtt tac aag atg gaa aaa gat gaa caa atc cca gat gga atg tgc att	624
Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile	
195	200 205
gat gtt gag ggg aag ctt tgg gtg gcc tgt tac aat gga gga aga gta	672
Asp Val Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val	
210	215 220
att cgc cta gat cct gag aca ggg aaa aga ctg caa act gtg aag ttg	720
Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val Lys Leu	
225	230 235 240
cct gtt gat aaa aca act tca tgc tgc ttt gga ggg aag gat tac tct	768
Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asp Tyr Ser	
245	250 255
gaa atg tac gtg aca tgt gcc agg gat ggg atg agc gcc gaa ggt ctt	816
Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Met Ser Ala Glu Gly Leu	
260	265 270
ttg agg cag cct gat gct ggt aac att ttc aag ata aca ggt ctt ggg	864
Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly	
275	280 285
gtc aaa gga att gct cca tat tcc tat gca ggg taa	900
Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala Gly	
290	295 300

<210> 2
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 2

Met	Ser	Ser	Ile	Lys	Ile	Glu	Cys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Arg	Cys
1				5					10					15	
Gly	Glu	Ser	Pro	Val	Trp	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Cys	Leu	Leu	Phe	Val
			20					25					30		
Asp	Ile	Pro	Ser	Lys	Thr	Val	Cys	Arg	Trp	Asp	Ser	Ile	Ser	Asn	Arg
		35					40					45			
Val	Gln	Arg	Val	Gly	Val	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Arg
	50					55				60					
Gln	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile	Gly	Thr	Lys	Phe	Cys	Ala	Leu
65				70					75					80	
Asn	Trp	Glu	Asp	Gln	Ser	Val	Phe	Ile	Leu	Ala	Met	Val	Asp	Glu	Asp
				85					90					95	
Lys	Lys	Asn	Asn	Arg	Phe	Asn	Asp	Gly	Lys	Val	Asp	Pro	Ala	Gly	Arg
		100						105					110		
Tyr	Phe	Ala	Gly	Thr	Met	Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Glu
	115					120					125				
Arg	His	Gln	Gly	Ser	Leu	Tyr	Ser	Leu	Phe	Pro	Asp	His	Ser	Val	Lys
	130					135					140				
Lys	Tyr	Phe	Asn	Gln	Val	Asp	Ile	Ser	Asn	Gly	Leu	Asp	Trp	Ser	Leu
145				150						155				160	
Asp	His	Lys	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Ser	Leu	Ser	Tyr	Thr	Val	Asp
				165					170					175	
Ala	Phe	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Asn	Arg	Arg	Thr
		180						185					190		
Val	Tyr	Lys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Gln	Ile	Pro	Asp	Gly	Met	Cys	Ile
	195					200						205			
Asp	Val	Glu	Gly	Lys	Leu	Trp	Val	Ala	Cys	Tyr	Asn	Gly	Gly	Arg	Val
	210					215					220				
Ile	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Lys	Arg	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Leu
225					230					235				240	

09.12.03

名 義 変 更 届

特許庁長官

殿

1. 国際出願の表示 PCT/JPO2/09611

2. 出 願 人

名 称 独立行政法人科学技術振興機構
Japan Science and Technology Agency
あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号
4-1-8, Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama
332-0012 JAPAN
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

3. 届け出の内容 新名義人

事件との関係 米国を除く全ての指定国における出願人

名 称 独立行政法人科学技術振興機構
Japan Science and Technology Agency
あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号
4-1-8, Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama
332-0012 JAPAN
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

事件との関係 指定国米国における出願人及びすべての指定国における発明者

氏 名 山口 正義 YAMAGUCHI Masayoshi
あて名 〒491-0913 日本国静岡県静岡市瀬名川一丁目15番5号
15-5, Senagawa 1-chome
Shizuoka-shi, Shizuoka
491-0913 JAPAN
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

4. 代 理 人

氏 名 (10798) 弁理士 廣田 雅紀
HIROTA Masanori

あて名 〒107-0052 日本国東京都港区赤坂二丁目8番5号
若林ビル3階



3F, Wakabayashi Bldg., 8-5,
Akasaka 2-chome, Minato-ku,
Tokyo 107-0052 JAPAN

5. 添付書類の目録 (1) 代理権を証明する書面

1通